

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520081153466

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞在环孢素 A 作用下介导  
小鼠异位心脏移植急性排斥反应的研究

The Effect of Memorial CD4<sup>+</sup> T Cell in Acute Rejection on  
Heterotopic Heart Transplantation in Mice with  
Cyclosporine A

王思名

指导教师姓名: 单忠贵 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 5 月

记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞在环孢素A作用下介导小鼠异位心脏移植急性排斥反应的研究

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘要

### 背景及目的

器官移植已成为许多实质器官终末期疾病唯一有效的治疗方法,但仍面临着许多挑战。尽管免疫抑制剂的发展日新月异,器官移植的排斥反应仍然是导致移植失败的主要原因。近年的研究发现,免疫记忆可能是导致免疫抑制剂失效的元凶。目前,移植受体体内因反复输血、多次妊娠、微生物感染、长期血液透析和再次移植产生的预存抗体,因记忆性体液免疫可导致急性排斥反应已成为共识。然而,现阶段临床主流免疫抑制剂几乎都是针对抑制初始 T 细胞的激活和归巢功能,而记忆性 T 细胞的激活和归巢途径与初始 T 细胞明显不同。研究证实,在大剂量应用免疫抑制剂的患者体内,仍有大量记忆性 T 细胞的存在,这就表明免疫抑制剂并不能抑制同种反应性记忆性 T 细胞的形成。本研究在小鼠同种异系心脏移植模型的基础上,探讨记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞在免疫抑制剂作用下是否仍能导致急性排斥反应,对提高器官移植质量、增加器官移植患者生存几率具有重要意义。

### 方法

#### 1. 皮肤预致敏模型的建立

以近交系 BALB/C 小鼠为供体,近交系 C57BL/6 小鼠为受体,进行背部皮肤移植。

#### 2. CD4<sup>+</sup>记忆性 T 细胞的分离、纯化及表型鉴定

皮肤移植 8 周后,取受体鼠脾脏,制备脾淋巴细胞悬液。用小鼠 CD4<sup>+</sup>记忆性 T 细胞磁珠分选试剂盒分离出 CD4<sup>+</sup>记忆性 T 细胞并进行活性鉴定。加入相应抗体后,用流式细胞仪鉴定其表型。以同样的方法,用小鼠未致敏 CD4<sup>+</sup>T 细胞免疫磁珠分选试剂盒重复上述步骤,获得未致敏 CD4<sup>+</sup>T 细胞。

#### 3. 过继性记忆性心脏移植模型

将预致敏 C57BL/6 小鼠脾脏 Tm 细胞过继转移给正常 C57BL/6 小鼠,然后以 BALB/c 小鼠为供体,采用套管法进行颈部异位心脏移植。

#### 4. 检测指标

移植物生存期观察：术后每日触摸颈部搏动情况判断移植物是否存活，搏动停止即判断为完全排斥。

移植心脏的病理学检测：取移植物心底部分，制做冰冻切片 并行 H&E 染色，光镜下观察。器官排斥程度参照 ISHLT 标准进行判定，并进行组间的比较

#### 结果

1. 流式细胞仪鉴定磁珠分选法分离出的  $CD4^+$ 记忆性 T 细胞浓度大于 92%，可用于细胞输注
2. 皮肤移植模型制作成功率 95%，心脏移植模型制作成功率 82.5%。心脏移植实验组与对照组供心中位存活时间分别为 7d 与  $>30d$ 。两者差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。
3. 冰冻切片示实验组心肌细胞变性坏死，血管周围及间质中有大量炎性细胞浸润;对照组心肌间质中有少量炎性细胞浸润。按 ISHLT 标准分级比较后经秩和检验结果显示实验组的移植物急性排斥反应程度高于对照组。

#### 结论

本实验证实预先输注  $CD4^+$ 记忆性 T 细胞的小鼠，其供心存活时间明显短于对照组，且供心急性排斥反应级别与对照组相比较高，说明  $CD4^+$ 记忆性 T 细胞在免疫抑制剂作用下仍能导致急性排斥反应，导致移植物坏死。分析其原因可能为所选用的免疫抑制剂无法抑制  $CD4^+$ 记忆性 T 细胞的激活。而  $CD4^+$ 记忆性 T 细胞的活化途径究竟如何绕开所选免疫抑制剂的作用，及何种免疫抑制药物能够抑制记忆性  $CD4^+$ T 细胞的活化等,还有待进一步研究。

**关键词：**记忆性  $CD4^+$ T 细胞；器官移植；急性排斥反应

## Abstract

### Background and objectives

Organ transplantation has been the only effective approach of treating some end-stage diseases, but still faced many challenges. Although the immunosuppressant technique has a large development during the last decade, the graft rejection is still the main reason of the failure of organ transplantation. Recent research shows that failure of immunosuppressant may be due to the immunological memory. At present, the antibody in transfer recipients, which was produced by numerous blood transfusion, frequent pregnancy, infection, long-term hemodialysis and retransplantation, was widely considered to induce the acute rejection through memorial humoral immunity. However, most clinical immunosuppressant was designed to suppress the activation and homing of naïve T cell, while the memory T cell obviously share a different way of activation and homing. It was verified that numerous memory T cell could be found in patient who had taken a large dose of immunosuppressant, which means the generation of memory T cell will not be prevented by immunosuppressant. This study establishes the animal models of heart transplantation in mice to investigate whether the induction of acute rejection due to CD4<sup>+</sup> memory T cell can be suppressed within the participation of immunosuppressant, and finally improve the survival probability of organ transplant recipient.

### Method

1. Allograft skin transplantation animal models were established with BALB/C mice as donors, while C57BL/6 mice as receptors.
2. CD4<sup>+</sup> memory T cells were separated from C57BL/6 mice's spleens by way of MACS and identified by flow cytometry.
3. Cervical heterotopic heart transplantation animal models were established with BALB/C mice as donors, while C57BL/6 mice as receptors. These models were

divided into two groups: the models which had injection of CD4<sup>+</sup> memory T cells before transplantation as experimental group; while the models which had injection of naïve CD4<sup>+</sup>T cells before transplantation as control group.

4. Observing heart grafts survival time after transplantation. Grafts were harvested on 5day Post-transplantation HE staining was performed to detect histological changes.

## Results

1. The concentration of CD4<sup>+</sup> memory T cells separated by MACS is over 92%, which means they can be used to inject.
2. The success rate of Allograft skin transplantation is 95%, while cervical heterotopic heart transplantation 82.5%. The median survival time of experimental group was 7d, and in the control group, it was over 30d.
3. Cardiocytes necrosis and progressive interstitial lymphocytic infiltration surrounded vessels can be seen in experimental group, and less interstitial lymphocytic infiltration in control group.

## Conclusion

This study reported that the acute rejection could be induced by CD4<sup>+</sup> memory T cell within the participation of immunosuppressant (Csa). It might be due to that Csa could not suppress the activation of CD4<sup>+</sup> memory T cell. In future research, we should find out the detailed activation way of CD4<sup>+</sup> memory T cell and finally manufacture the immunosuppressant that can suppress the activation of CD4<sup>+</sup> memory T cells.

**Key words:** CD4<sup>+</sup> memory T cell; organ transplantation; acute rejection



# 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
目 录.....	V
TABLE OF CONTENTS.....	VII
第一章 前 言.....	1
1.1 器官移植与免疫记忆.....	1
1.2 记忆性 CD4 <sup>+</sup> T 细胞的产生.....	1
1.3 记忆性 CD4 <sup>+</sup> T 细胞在急性排斥反应中的作用.....	4
1.4 实验设计.....	4
1.5 研究意义.....	5
第二章 材料及方法.....	7
2.1 材料.....	7
2.2 方法.....	8
2.3 统计学处理.....	12
第三章 结果与分析.....	14
3.1 小鼠皮肤移植的结果.....	14
3.2 记忆性 CD4 <sup>+</sup> T 细胞的分离、纯化及鉴定.....	14
3.3 比较分别输入不同 CD4 <sup>+</sup> T 细胞后, 小鼠心脏移植存活时间.....	15
3.3.1 小鼠心脏移植结果.....	15
3.3.2 供心生存时间比较分析.....	16
3.3.3 病理切片比较.....	17

第四章 讨论与展望 .....	20
4.1 同种小鼠颈部心脏移植模型的建立 .....	20
4.2 记忆 T 细胞的诱导产生、纯化及鉴定 .....	22
4.3 在环孢素 A 作用下, 记忆性 CD4 <sup>+</sup> T 细胞对小鼠颈部心脏移植急性排斥反 应的影响 .....	24
4.4 结论 .....	26
参 考 文 献 .....	27
英文缩略词表 .....	32
综述 .....	33
参 考 文 献 .....	38

## Table of Contents

<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 Organ transplantation and immunological memory .....	1
1.2 Generation of memorial CD4+ T cell .....	1
1.3 The effect of memorial CD4+ T cell in acute rejection.....	4
1.4 Experiment design .....	4
1.5 Research significance .....	5
<b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>	<b>7</b>
2.1 Materials.....	7
2.2 Methods .....	8
2.3 Statistical treatment.....	12
<b>Chapter 3 Experimental results and Conclusion .....</b>	<b>14</b>
3.1 Results of skin transplantation in homogeneity variant mice .....	14
3.2 The production and purify and verification of memory CD4 T cell.....	14
3.3 Comparing of allografts survival time .....	15
3.3.1 Results of cervical heterotopic heart transplantation in mice .....	15
3.3.2 Analysis of allografts survival time .....	16
3.3.3 Histological Analysis .....	17
<b>Chapter 4 Discussion and expetation .....</b>	<b>20</b>
4.1 The establishment of cervical heterotopic heart transplantation in mice ..	20
4.2 The production and purify and verification of memory CD4 T cell.....	22
4.3 The Effect of Memorial CD4+ T Cell in Acute Rejection on Heterotopic Heart Transplantation in Mice with Cyclosporine A .....	24
4.4 Conclusion .....	26
<b>References .....</b>	<b>27</b>
<b>Abbreviation .....</b>	<b>32</b>

<b>Reviw .....</b>	<b>33</b>
--------------------	-----------

<b>References .....</b>	<b>38</b>
-------------------------	-----------

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 器官移植与免疫记忆

近十年来,临床器官移植,特别是大器官移植技术已日臻完善,移植手术成为临床常规手术。但移植免疫学的发展,远远落后于外科移植技术的发展,移植排斥反应仍是导致移植器官功能丧失的主要原因之一<sup>[1]</sup>。

免疫记忆是由记忆性 T 细胞介导的免疫反应,是机体抵抗外源性病原体感染的有效手段,但在器官移植中却起着极为不利的作用。临床器官移植中受体内预存的同种反应性记忆 T 细胞对于供体移植器官的存活是一极大的威胁<sup>[2]</sup>。患者可能因为同种抗原的直接接触,如输血、既往的同种移植手术以及妊娠等,也可能通过异种微生物的接触甚至感染,因交叉反应产生异源性免疫,在体内存在一定数量的同种反应性记忆性 T 细胞<sup>[3][4]</sup>。实验证实,在介导排斥反应方面,同种反应性记忆 T 细胞在反应速度、强度及敏感性各方面均强于幼稚初始 T 细胞,由其介导的排斥反应由于其快速的特性,通常称之为急性加速性移植排斥反应<sup>[5][6]</sup>。

### 1.2 记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的产生

记忆性 T 细胞分为 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>两个亚类,两者均可单独介导记忆排斥反应。记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞能促进记忆性 CD8<sup>+</sup>T 细胞和记忆性 B 细胞的形成和活化增殖,其产生机制如下:未致敏的 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别外来抗原致敏、活化,成为效应细胞(effector T cell)产生免疫效应。正常生理情况下,感染控制或抗原刺激减弱后,大部分效应细胞凋亡,少部分转化为记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞(memory T cell)。这些记忆 T 细胞可以在体内存活很长时间,主要分布于非淋巴器官,保持着低速分裂,维持着记忆 T 细胞达到一定水平。记忆 T 细胞的谱系关系目前尚无定论,存在多种假说,传统的观点认为在初次应答结束后,绝大多数效应细胞会发生活化诱导的细胞凋亡(activation-induced cell death, AICD),但一小部分会存活下来成为静息的记忆细胞,这就是经典的线性分化理论。后来又有人提出记

忆 T 细胞的平行分化理论, 该观点认为由于某种原因, 在抗原及其他刺激的作用下, 一部分原始 T 细胞分化成为效应 T 细胞, 而另一部分分化为记忆 T 细胞<sup>[7][8]</sup>。根据归巢特点和效应功能将记忆 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞至少分为两个亚群: 中央型记忆 (central memory, T<sub>CM</sub>) T 细胞和效应型记忆 (effector memory, T<sub>EM</sub>) T 细胞<sup>[9]</sup>。记忆性 T 细胞的发育过程至今未被充分了解, 人们尚不能确定记忆性 T 细胞是效应性 T 细胞的直系后裔还是沿着另外一条单独的谱系发育的<sup>[10]</sup>。谱系关系难以确定, 很大原因之一是目前尚未有合适的表面分子用以区别记忆与效应 T 细胞。

近年来国外试验已证实这种可能: 即使清洁级实验动物, 仍因为成长过程中接触到食物或环境中的抗原而致敏产生记忆性 T 细胞, 部分记忆性 T 细胞能够对同种异体抗原产生效应<sup>[11][12]</sup>。同理, 人类成长过程中由于细菌, 病毒感染及输血, 分娩等因素使 T 细胞致敏, 并形成记忆性 T 细胞, 这部分记忆性 T 细胞虽然没有受到供体抗原致敏, 但仍能够对供体抗原快速产生效应<sup>[13]</sup>。目前国内免疫学家正致力于记忆性 T 细胞在移植免疫中的作用机理研究, 对于记忆性 T 细胞的产生机理、长期维持、再次接触抗原增殖特性以及细胞因子的表达等诸多方面尚无定论<sup>[14][15][16]</sup>。

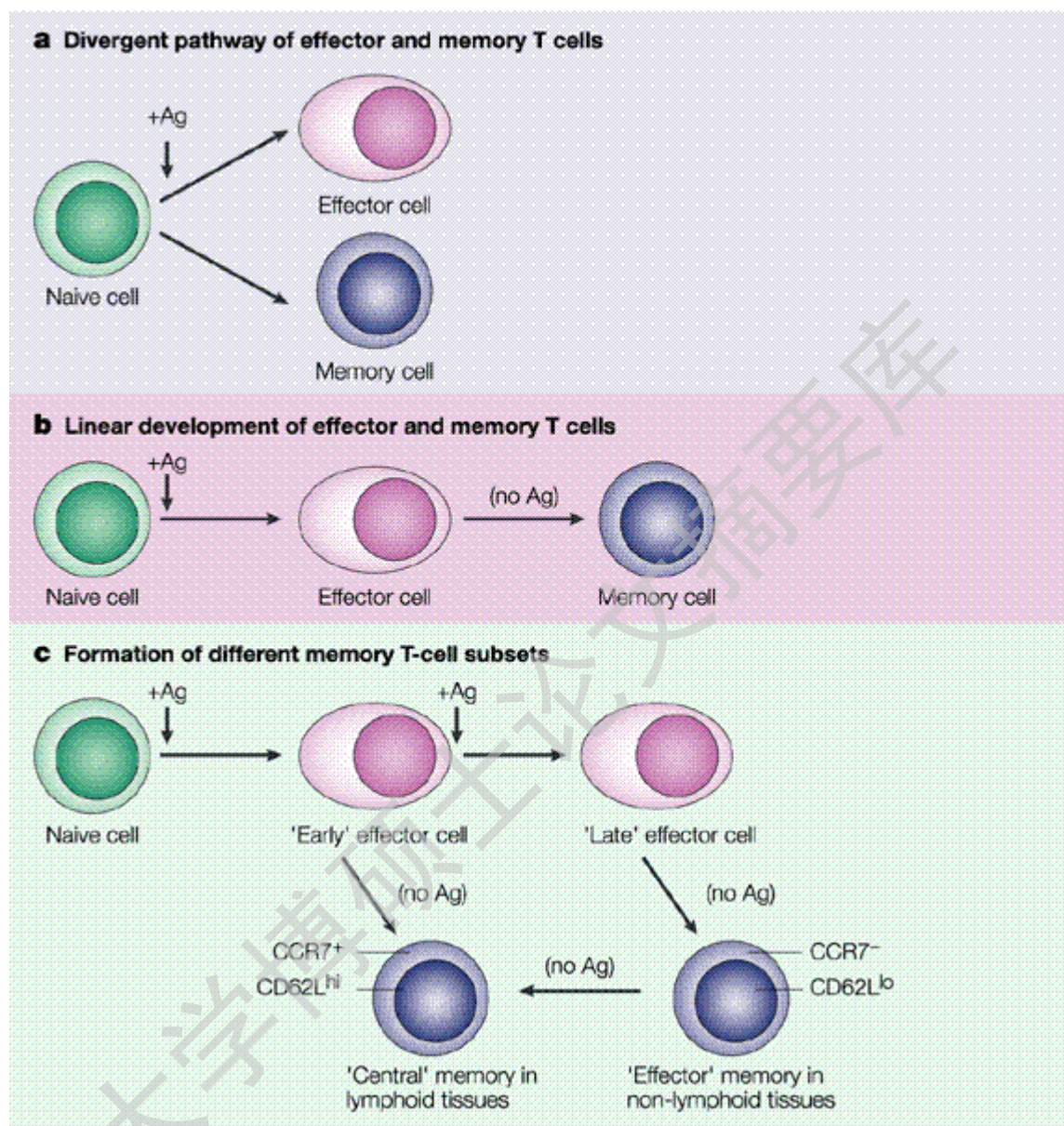


图 1 T 细胞的分化<sup>①</sup>

<sup>①</sup> Susan M. Kaech, E. John Wherry & Rafi Ahmed. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development ature Reviews [R].Immunology,2002, April (2): 251-262.

### 1.3 记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞在急性排斥反应中的作用

既往器官移植免疫排斥反应研究多侧重于未致敏的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,而对记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的作用少有涉及。此外有一个尚未引起足够重视的问题,那就是受体移植前已经存在的未经移植物抗原致敏但因为其他抗原致敏能够对移植物抗原产生效应的记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的作用。记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞所具有的特征对于机体抵抗感染等外来致病源是非常有效的手段,但在器官移植中,却产生非常不利的作用。动物实验显示:器官移植排斥反应发生后的受体再次接受同一供体器官移植,其排斥反应速度明显加快,同样,临床病人因为排斥反应造成器官功能丧失者,再接受第二次器官移植时,生存时间明显低于第一次器官移植病人<sup>[17]</sup>。Shiao SL<sup>[18]</sup>等在动物模型试验中指出:记忆性 T 细胞在外周血中所占比例与同种异体移植排斥反应发生的几率正相关。同时应当注意的是,目前临床主流免疫抑制剂几乎都是针对抑制初始 T 细胞的激活和归巢功能,而记忆性 T 细胞的激活和归巢途径与初始 T 细胞明显不同。研究证实<sup>[19]</sup>,在大剂量应用免疫抑制剂的患者体内,仍有大量记忆性 T 细胞的存在,这就表明免疫抑制剂并不能抑制同种反应性记忆性 T 细胞的形成。我们提出:这种记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞虽然数量少,但由于具有快速反应特征及有可能存在对免疫抑制剂不敏感的特性,可能对急性排斥反应的发生起着重要的作用。目前,国外对记忆性 T 细胞的研究主要侧重于探讨不同亚群在免疫反应中的作用<sup>[20]</sup>,而对 CD4<sup>+</sup>T 细胞在免疫抑制剂使用时对急性排斥反应的作用及机制尚无详细研究。本课题提出假设:记忆性 CD4<sup>+</sup>T 细胞不受多数主流免疫抑制剂作用,仍然识别供体抗原致敏活化,快速增殖,成为效应细胞,分泌炎症前细胞因子,快速移动到移植物内,协助受体体内其他未致敏免疫细胞抵抗环孢素 A 抑制而活化,在各方面共同作用下,最终导致急性排斥反应发生,移植器官功能丧失。

### 1.4 实验设计

#### 1. 皮肤预致敏模型的建立

以雄性 BALB/C 纯系小鼠为供体,雄性 C57BL/6 纯系小鼠为受体,进行背



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库